UNIVERSITÉ DE LAUSANNE — FACULTÉ DE MÉDECINE
SERVICE DE CHIRURGIE — DIRECTEUR: PROFESSEUR F. SAEGESSER

Lyophilisation et conservation en milieu nutritif d'homogreffes dure-mériennes

THÈSE

PRÉSENTÉE A LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE L'UNIVERSITÉ DE LAUSANNE
POUR L'OBTENTION DU GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE

PAR

JACQUES VEUTHEY

Médecin diplômé de la Confédération suisse
Originaire de Saxon (Valais)

LAUSANNE
IMPRIMERIE LA CONCORDE

1960

UNIVERSITÉ DE LAUSANNE — FACULTÉ DE MÉDECINE
SERVICE DE CHIRURGIE — DIRECTEUR: PROFESSEUR F. SAEGESSER

Lyophilisation et conservation en milieu nutritif d'homogreffes dure-mériennes

THÈSE

PRÉSENTÉE A LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE L'UNIVERSITÉ DE LAUSANNE
POUR L'OBTENTION DU GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE

PAR

JACQUES VEUTHEY

Médecin diplômé de la Confédération suisse
Originaire de Saxon (Valais)

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

LAUSANNE
IMPRIMERIE LA CONCORDE

~~1959~~
1960

UNIVERSITÉ DE LAUSANNE

FACULTÉ DE MÉDECINE

Le Conseil de la Faculté de médecine de l'Université de Lausanne, après avoir pris connaissance des rapports favorables de MM. les professeurs Frédéric Saegesser et Eugène Urech, et sans se prononcer sur les opinions du candidat, autorise l'impression de la thèse intitulée :

Lyophilisation
et conservation en milieu nutritif
d'homogreffes dure-mériennes

présentée par M. Jacques VEUTHEY, pour l'obtention du grade de docteur en médecine.

Lausanne, le 15 février 1960.

Le doyen :
Professeur E. B. Streiff.

A mes parents

A Monsieur le Professeur F. Saegesser, qui a bien voulu m'accueillir dans son Service, en témoignage de reconnaissance et de respect. Sous sa ferme et bienveillante direction, j'ai appris à aimer la Chirurgie.

I

INTRODUCTION

Jusqu'à maintenant, lorsqu'il était nécessaire de combler une solution de continuité dans une dure-mère, pour éviter une fistule de liquide céphalo-rachidien, on disposait de greffes de fascia lata, d'amnios, ou de films de polyéthylène et d'autres prothèses encore.

Une solution de continuité de la dure-mère, nécessitant de telles interventions plastiques, peut être causée :

1° par un traumatisme de la convexité ou de la base et, dans ce dernier cas, qu'on rencontre par exemple dans les gros éclatements de la boîte cranienne par coup de feu, la solution de continuité, si elle se trouve au niveau de la lame criblée, doit être comblée pour éviter une rhinorrhée, avec toutes les complications possibles (méningite) ;

2° par l'extirpation d'un méningiome ;

3° par des opérations intra-craniennes n'intéressant pas la dure-mère, mais déterminant un œdème cérébral tel qu'il n'est plus possible de refermer le plan dure-mérien.

Le prélèvement de fascia lata avait l'inconvénient de prolonger la durée d'une opération et d'occasionner des cicatrices ou des hernies musculaires qui sont parfois inesthétiques (jeunes filles) et gênantes ; mais surtout, le fascia lata est plus épais et moins plastique qu'une dure-mère. Les résultats obtenus, cependant, étaient bons.

L'utilisation d'amnios est incommode, à cause de sa fragilité ; nous sommes mal renseignés quant aux résultats obtenus avec ces greffes.

Quant aux films de polyéthylène, ils n'ont pas donné les résultats escomptés ; ils se laissent difficilement suturer (déchirures), ne forment pas un plan étanche (fistules), et sont souvent mal supportés. La plupart des neurochirurgiens ont abandonné cette méthode.

Alors que nous étions aux prises avec ces difficultés, notre attention a été attirée par une publication américaine signalant que de bons résultats avaient été obtenus avec des greffes de dures-mères lyophilisées.

Nous inspirant de ce qui a été fait dans le domaine des greffes artérielles, nous avons mis au point une technique simple de préparation de dures-mères en vue soit de les conserver en milieu nutritif, soit de les lyophiliser. Avec ces deux méthodes de conservation il est facile de créer une banque de dures-mères permettant d'avoir constamment des greffes à disposition.

Une banque de dures-mères lyophilisées peut être établie dans tout centre pouvant disposer d'un appareil à lyophiliser ; de tels appareils sont maintenant

répandus, et peuvent facilement être obtenus partout à des prix abordables. Des greffes lyophilisées présentent les multiples et précieux avantages d'être inaltérables pendant plusieurs années (6), de ne nécessiter aucun entretien, d'être indépendantes du milieu ambiant, et d'être facilement et rapidement transportables. Grâce à une telle banque on aura sous la main des dures-mères prêtes à être employées immédiatement n'importe quand.

La méthode qui consiste à conserver les dures-mères dans un milieu nutritif (en glacière) a l'avantage d'être simple, de ne nécessiter aucune installation spéciale ; mais l'inconvénient de cette méthode est que les greffes ne peuvent être conservées ainsi que pendant une durée assez courte de un à deux mois (4), exceptionnellement un peu plus longtemps.

Pour ce qui est des greffes artérielles, les travaux qui ont été faits démontrent que la qualité des greffons conservés selon les deux méthodes énumérées est comparable. Les premiers résultats de greffes obtenus à Lausanne permettent de penser qu'il en est de même pour les greffons dure-mériens.

Dans ce travail nous nous proposons de décrire les techniques d'obtention, de préparation, de conservation en milieu nutritif, de stérilisation et de lyophilisation des greffes de dures-mères telles que nous les avons mises au point. Nous y ajouterons quelques remarques d'ordre théorique principalement sur le sujet de la lyophilisation. Enfin nous citerons et commenterons les premiers résultats de réimplantation de greffons obtenus.

II

OBTENTION DES GREFFES

On peut en général facilement obtenir des dures-mères dans un institut de pathologie ou de médecine légale. Prélever des dures-mères stérilement demanderait un travail considérable et nous aliénerait la bonne volonté du personnel de ces instituts, car elle prolongerait considérablement la durée d'une autopsie. Il est donc pratiquement impossible d'obtenir des dures-mères stériles.

Il est par contre tout à fait simple de se procurer des greffes, en forme de calotte, qui seront bien entendu contaminées, lors des autopsies de routine ; il n'est pas nécessaire, pour le prélèvement, de changer d'instruments et de gants. Nous verrons plus loin qu'on peut facilement les stériliser par un agent chimique, et cela sans altérer la qualité de la greffe.

Le choix du donneur est important. Le meilleur matériel est celui fourni par les sujets jeunes, en bonne santé, ayant succombé à une mort rapide : enfants mort-nés des maternités, sujets victimes d'accidents, toxicomanes ayant pris une dose excessive. Il faudra éviter de prélever des greffes chez les sujets dont la mort a été causée par des affections malignes ou infectieuses. Le délai de prélèvement est de douze à vingt-quatre heures, à condition que le corps ait été conservé sous réfrigération.

Sitôt prélevée, la greffe sera plongée, pour le transport, dans un flacon contenant simplement une solution physiologique, non stérile. Le lavage et le découpage de la greffe se fera aussitôt après ; si ce n'est pas possible, on conservera le flacon au frigidaire, à +4° C, après y avoir ajouté des antibiotiques (1 million d'unités de pénicilline et 1 gr. de streptomycine pour 500 cc. de solution).

A Lausanne, nous notons sur une fiche qui pourra ensuite être collée dans le dossier du receveur, ou sur un cahier, le numéro d'ordre, la date du prélèvement, le nom du donneur, son âge, et la cause de la mort. Le numéro d'ordre est suivi d'une lettre indiquant la qualité de la greffe (l'estimation de la qualité se fera d'après l'âge du donneur et la cause de la mort) : E = excellente, M = moyenne, S = suffisante. Nous n'employons les greffes M et S qu'en cas d'épuisement des greffes E. D'autre part, nous faisons précéder le numéro d'ordre des lettres MN si la greffe est conservée en milieu nutritif et L si elle est lyophilisée. Exemple de numérotation : L15M.

Préparation des greffes

La dure-mère qui vient d'être prélevée sera mise dans un cristallisoir contenant une solution physiologique, non stérile. Dans ce cristallisoir on lavera la greffe, puis on découpera la calotte en deux moitiés (on n'emploiera jamais plus qu'une moitié par opération) en excisant le sinus longitudinal. Les bords de la pièce ainsi obtenue seront rapprochés par quelques points de lin de façon à obtenir une greffe de forme cylindrique, ce qui permettra de la suspendre facilement dans un tube à lyophiliser. On mettra encore, à l'une des extrémités, deux petites anses en fil de lin pour la suspension. Il va de soi que si on n'a pas l'intention de lyophiliser la greffe, il est inutile de la coudre.

Ce travail une fois terminé, la dure-mère sera mise dans un milieu conservateur stérile, contenant des antibiotiques, soit provisoirement, en attendant d'être lyophilisée, soit définitivement.

III

CONSERVATION DES GREFFES EN MILIEU NUTRITIF

Cette méthode de conservation est due à Gross et à Hanks. Ces auteurs, s'inspirant des milieux utilisés par les histologistes pratiquant les cultures de tissus, ont constitué un milieu nutritif — le milieu de Gross-Hanks — pour la conservation des greffes artérielles, composé d'une solution d'électrolytes tamponnée à laquelle est ajoutée 10 % de sérum homologue.

Gross estimait qu'il est essentiel que les greffes soient « vivantes » au moment de leur transplantation, et pensait les garder en état de vie latente en les conservant dans son milieu, enrichi de 1 % de glucose et d'antibiotiques, en glacière à +4° C. En réalité, en conservant des greffes de cette façon, la vie n'est pas suspendue, comme lors d'une congélation rapide (voir chapitre de la lyophilisation), mais simplement ralentie ; les processus métaboliques se poursuivent, bien

que moins intensivement, et chaque jour le tissu perd une partie de son potentiel de récupération. L'expérimentation animale a confirmé ces vues et nous a appris que les vaisseaux conservés en milieu nutritif ne survivent pas après leur transplantation.

Nous verrons plus loin qu'il n'est pas nécessaire, pour ce qui est des dures-mères, d'avoir des greffes « vivantes », et qu'il est même préférable qu'elles soient « mortes » ; la greffe, en effet, n'est qu'un simple échafaudage qui sera envahi par un tissu conjonctivo-vasculaire issu du voisinage ; la colonisation sera plus rapide si la greffe a perdu sa vitalité ; cette perte confère en outre à la greffe une atténuation de ses caractères de spécificité, ce qui lui assurera une meilleure tolérance de la part du récepteur. Pour cette raison il nous a semblé inutile de conserver nos greffes dans le milieu de Gross-Hanks, dont la préparation est relativement complexe. D'autre part, on a démontré que les microorganismes sont moins facilement détruits par le processus de la lyophilisation s'ils ont auparavant été conservés dans des milieux contenant du sérum ou du glucose.

Aussi employons-nous simplement, comme milieu nutritif, une solution physiologique stérile. En prévision de la stérilisation par le bêta-propiolactone (voir chapitre suivant) on ajoutera à cette solution du bicarbonate de soude, qui rendra la solution légèrement alcaline, et du rouge de phénol comme indicateur, selon la formule suivante :

Solution physiologique (NaCl à 9 °/₀₀)	500 ml.
Bicarbonate de soude	8,4 gr.
Rouge de phénol	0,025 gr.

Stériliser la solution une demi-heure à la vapeur fluente.

En pratique, les greffons étant lavés, découpés et cousus, ou non, seront plongés dans le milieu ci-dessus, auquel on ajoutera des antibiotiques, puis seront conservés au frigidaire à +4° C. Par flacon de 500 cc., on ajoutera 1 million d'unités de pénicilline et 1 gr. de streptomycine ; on pourra y mettre les deux moitiés d'une même calotte dure-mérienne. Sur une étiquette on indiquera le numéro d'ordre des greffons et la date de leur prélèvement.

Nous utilisons les flacons de la banque de sang de la Croix-Rouge qui ont l'avantage d'être peu coûteux, pratiques, et d'avoir une capacité de 500 cc.

Les greffons pourront ainsi être conservés durant un à deux mois ; il est à conseiller de ne pas trop dépasser ce délai. En cas de besoin les greffes seront stérilisées, ce qui demande environ deux heures, puis pourront immédiatement être utilisées. On peut aussi stériliser les greffes préalablement, dès la mise en conserve, mais dans ce cas on court le risque d'une contamination ultérieure.

Si les greffons ne trouvent pas d'utilisation à bref délai, et si leur nombre est devenu suffisant, nous décidons de leur lyophilisation.

IV

STÉRILISATION DES GREFFES

De nombreuses méthodes ont été proposées pour stériliser les greffes. L'idéal serait d'avoir un agent qui détruise tous les germes infectieux sans nuire à la greffe.

Meeker et Gross avaient proposé l'irradiation par rayons cathodiques : cette méthode donne de bons résultats, mais nécessite une installation coûteuse. L'irradiation par rayons gamma a le même désavantage. D'autres auteurs ont employé l'oxyde d'éthylène ; le désavantage de la méthode est que cette substance est très explosive, irrite les voies respiratoires, et est caustique pour la peau ; d'autre part, la technique de lyophilisation sera rendue plus difficile si les greffes ont été stérilisées par cet agent (voir plus loin). La combinaison d'un traitement aux antibiotiques et de la lyophilisation a donné de bons résultats, mais ne nous semble pas assez sûre pour les dures-mères, où une stérilité absolue est de rigueur, le cerveau se défendant mal contre l'infection. On peut supposer, en effet, que ce traitement ne détruira ni les virus, ni les champignons.

A notre avis, la méthode de stérilisation au *bêta-propiolactone* (BPL) * nous semble de loin la meilleure ; elle est simple, mais il faut appliquer la technique de façon rigoureuse.

Le BPL, de formule développée : $H_2C - CH_2 - C = 0$ (avec C lié à O), est un liquide visqueux, soluble dans l'eau, dont le poids spécifique est de 1,149. C'est le composé le plus simple du groupe des bêta-lactones. Il réagit avec de nombreux radicaux, en particulier avec ceux des protéines, mais il est stable sous forme concentrée durant dix mois environ, s'il est conservé au frigidaire dans des ampoules scellées ; à température ambiante, il ne se conserve que deux à trois mois.

Le BPL est toxique mais, dans l'eau, il s'hydrolyse rapidement pour donner des composés non toxiques ; l'hydrolyse est plus rapide encore en présence de protéines. A cause de cette rapide transformation, le BPL doit être manié avec soin. A 37° C, dans l'eau, sa demi-vie est de trente à quarante-cinq minutes environ. Comme il est toxique, il faudra, lors de la stérilisation, le laisser à 37° C durant deux heures au moins, pour qu'il soit complètement hydrolysé.

Les composés formés lors de l'hydrolyse sont très acides, mais le fait que le BPL agit comme agent bactéricide et viricide du pH5 au pH9 donne une assez grande marge d'activité. Notre milieu nutritif, nous l'avons vu dans le chapitre précédent, est rendu légèrement alcalin par l'addition de bicarbonate de soude, en prévision, précisément, de la stérilisation par le BPL. L'indicateur employé, le rouge de phénol, devient jaune à un pH de 6,4. Suivant les greffes, il y a virage ou non ; si le virage est précoce, il est bon de neutraliser l'acidité avec une solution 0,2 — molaire stérile de bicarbonate de soude ; si le virage est tardif, la neutralisation n'est pas nécessaire.

Les auteurs américains ont démontré, dans leurs travaux (5, 10), que le BPL détruit toutes les bactéries, les spores, les virus, les champignons, à des concen-

* Le bêta-propiolactone nous a été fourni par la Maison Fluka AG., chemische Fabrik, Buchs SG (Suisse).

trations variant entre 0,05 et 0,7 %. En l'employant à une concentration de 1 %, on a donc une large marge de sécurité.

Des études ont montré que, pour les greffes artérielles traitées par le BPL, la structure histologique n'est pas altérée (10) ; il semble, d'autre part, d'après les cultures de tissus qui ont été faites, que la vitalité de ces greffes n'est pas compromise ; ceci démontre bien que le BPL n'a pas d'effet nuisible sur les greffes.

En pratique, lorsqu'on voudra stériliser une greffe, on ajoutera à la solution de conservation, préalablement chauffée à 37° C à l'étuve, du BPL de façon à obtenir une concentration de 1 % (en poids/volume). Pour nos flacons de 500 cc. nous avons fait préparer des ampoules scellées de 4 cc. de BPL. Le flacon sera mis à l'étuve à 37° durant deux heures. En cas de virage précoce au jaune du rouge de phénol, il faudra neutraliser avec du bicarbonate de soude. Une fois la stérilisation terminée, la greffe sera transvasée dans un autre flacon contenant uniquement de la solution physiologique stérile, comme solution de lavage. On veillera de façon rigoureuse à l'asepsie ; il est recommandé de flamber le goulot des flacons et de porter un masque.

La dure-mère pourra être employée aussitôt après le lavage, ou alors être mise en tube pour la lyophilisation (voir chapitre suivant). Si on désire encore la conserver un certain temps en milieu nutritif, il n'y a qu'à la laisser dans la solution de lavage à laquelle on n'oubliera pas d'ajouter des antibiotiques, pour éviter une contamination ultérieure.

Nous avons fait faire de nombreux examens bactériologiques poussés des liquides de lavage des dures-mères stérilisées au BPL ainsi que de fragments de ces dures-mères. Comme les auteurs américains, nous n'avons jamais trouvé de germes infectieux ; les cultures faites ont toujours été *stériles*.

La preuve semble donc faite que nous avons, avec le BPL, un excellent agent bactéricide pour les greffes en général, et les greffes de dures-mères en particulier.

V

LYOPHILISATION DES GREFFES

Généralités — Historique

On appelle lyophilisation une méthode de dessiccation sous vide poussé des produits biologiques à l'état congelé, par sublimation. Cette opération soustrait ces produits aux facteurs dénaturants tels que l'eau, l'oxygène, la chaleur, etc., et permet d'obtenir un produit sec, anhydre, inaltérable, que l'on peut conserver sous vide à température ordinaire pendant un temps très long, qui ne nécessite aucune surveillance, de transport aisé, et ayant la propriété de retrouver presque instantanément ses qualités premières, par simple réhydratation. On comprend facilement qu'il s'agit là d'une méthode de conservation idéale, actuellement largement utilisée dans les diverses branches de la biologie, et qu'elle représente

sans doute la meilleure solution au problème de la conservation à long terme des dures-mères.

C'est Carrel le premier qui eut l'idée, au début de ce siècle, de conserver des homogreffes artérielles par dessiccation sur du chlorure de calcium.

Mais la méthode de congélation-dessiccation est née des travaux effectués, dès 1909, par Shackell, qui recherchait une méthode de conservation des sérums et autres produits biologiques qui n'entraînât pas la dégradation des anticorps et des antigènes. En 1935 Flosdorf et Mudd publient la description d'un appareil et d'une technique permettant de conserver les sérums et autres substances biologiques, à échelle commerciale, par congélation-dessiccation. A la même époque, Reichel appliquait le terme « lyophile », c'est-à-dire ami des solvants, aux sérums ainsi traités, et l'opération amenant un corps à cet état fut dénommée « lyophilisation ». En 1949, Hyatt introduisit la lyophilisation comme méthode pour obtenir la conservation indéfinie des os et des vaisseaux sanguins. Peu après Marrangoni et Cecchini réalisaient, aux Etats-Unis, les premières greffes expérimentales avec des vaisseaux lyophilisés, qui donnèrent d'excellents résultats.

Nous voyons donc que la méthode de congélation-dessiccation est un procédé d'utilisation récente, qui s'est généralisée principalement durant cette dernière décade.

Principes physiques de la congélation-dessiccation

Nous nous proposons simplement ici de rappeler sommairement ces principes, renvoyant, pour plus de détails, aux nombreux ouvrages spécialisés.

Les protéines desséchées restent stables en absence d'oxygène. Si on les desséchait par simple évaporation elles se dénatureraient, alors que la dessiccation par sublimation, sous vide et après congélation, exécutée à une température inférieure aux températures spécifiques des protéines et au point de fusion de l'eutectique de point de fusion le plus bas des constituants minéraux cellulaires, a l'incomparable avantage de ne pas modifier ces dernières.

La marche est simple. En résumé, une substance est congelée puis mise sous vide, où l'eau qu'elle contient est sublimée, c'est-à-dire que la glace retourne directement à l'état de vapeur, sans passer par la phase liquide, pour autant qu'il y ait un apport suffisant de calories nécessaires pour ce processus (670 cal. par gramme, Greaves, 1946). Le vide est créé par une pompe mécanique. Comme la vapeur d'eau diminue l'efficience mécanique de cette pompe, on l'interceptera au moyen d'une paroi froide sur laquelle elle se désublimera et redeviendra de la glace.

La tension de vapeur de la glace est proportionnelle à la température et exprime la tendance des molécules à quitter sa surface. Plus cette tendance est grande, plus rapidement se déroulera la sublimation, si un bon vide est maintenu. Une fois l'air évacué, la pression partielle de la vapeur d'eau sublimée représente la pression totale du système. Ainsi, la pression totale renseigne sur la température des produits en dessiccation. La chaleur fournie pour le processus de la sublimation conserve les produits congelés. Lorsque la sublimation est terminée, les produits se mettent alors à la température ambiante.

Les produits ainsi deshydratés, nous l'avons déjà dit, possèdent soit une remarquable solubilité, soit la propriété de se gonfler lors d'une immersion ultérieure, attribuables à la conservation des propriétés des protéines et à la structure physique particulière qu'offrent les solides poreux.

Vitalité des greffes lyophilisées

La question de savoir si les greffons, après lyophilisation, sont encore en état de vie latente est très débattue. Divers chercheurs se sont penchés sur ce problème (11) et ont pratiqué, après reconstitution des greffes lyophilisées, des tests de vitalité (étude de la contractilité des segments artériels, cultures de tissus) ; le traitement des greffes avant la lyophilisation étant semblable (prélèvement stérile, bref séjour dans un milieu nutritif spécial), ils sont arrivés à des résultats contraires. Les uns n'hésitent pas à affirmer que les tissus sont morts, d'autres nous disent que si la lyophilisation est bien faite, le tissu doit recouvrer une vitalité normale.

Au début de cette ère de greffes, on attachait beaucoup d'importance à la viabilité, et Gross considérait la viabilité des greffes artérielles au moment de la transplantation comme indispensable.

Du point de vue pratique, cependant, il nous importe peu de savoir si les greffons sont viables ou non. L'expérimentation, en effet, nous a appris que même les greffes fraîches ne survivent pas après leur transplantation, et qu'elles ne constituent qu'une charpente, qui sera envahie par la prolifération centrale des tissus environnants de l'hôte, issus des anastomoses (fibroblastes).

Nous pensons qu'il est même souhaitable d'avoir des greffons morts, car l'invasion par les fibroblastes, les transformations histologiques et l'assimilation se font plus rapidement, grâce à une atténuation des caractères de spécificité de ces greffons.

Appareillage

C'est surtout un « empirisme raisonné » qui a présidé à la mise au point des appareils. Plusieurs types d'appareils à lyophiliser ont été décrits. Tous comprennent quatre parties essentielles :

— un compartiment de dessiccation ;

— un condenseur sur les parois duquel viendra se fixer la vapeur d'eau ; (ces deux compartiments forment le lyophilisateur proprement dit)

— une pompe à vide pour assurer l'évaporation de l'eau ;

— un appareil de mesure du vide.

L'installation est complétée par un appareillage mobile de scellage à la flamme.

Nous disposons d'un appareil * qui convient parfaitement à la lyophilisation de nos dures-mères (fig. 1).

Le dessiccateur est constitué par six tubes en verre Pyrex formés de deux parties (fig. 2) qui s'emboîtent par un joint rodé ; la partie supérieure est terminée par une tige qui sera raccordée à l'un des six joints de caoutchouc du type tétine

* Construit par la Maison Secfroid, Lausanne.

Fig. 1

On reconnaît : à gauche, la pompe à vide, au centre, le lyophilisateur proprement dit (remarquer les six tubes contenant chacun un greffon), et, à droite, le vacuomètre.

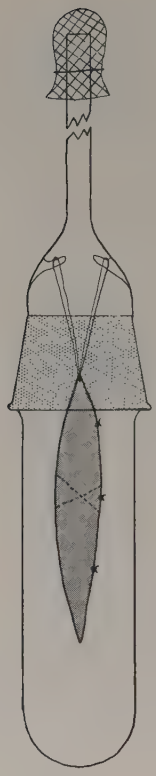

Fig. 2

On voit, à l'intérieur du tube, une greffe suspendue par deux petites anses en fil à des becs de verre. Coiffant l'extrémité de la tige, une compresse stérile pour éviter toute contamination.

adaptés au corps de l'appareil, et donnent à ce dernier l'aspect caractéristique en « hérisson », comme dans l'appareil à joints multiples initialement mis au point par Flosdorf. On peut ainsi « piquer » six tubes à la fois.

Le calibre de la tige doit être suffisant pour ne pas opposer une trop grande résistance à la pompe ; des tiges étroites exigeraient une élévation de la température de sublimation des greffons, ce qui est à éviter.

Dans notre appareil, le condenseur se trouve au-dessus du dessiccateur. Il est composé d'un vase de Dewar métallique destiné à recevoir le mélange réfrigérant (éthanol + carboglace). Ce même vase servira à la congélation des greffes.

La pompe à vide est une simple pompe mécanique de construction courante.

L'appareil de mesure intercalé entre le lyophiliseur et la pompe à vide est une jauge thermo-électrique du type Pirani, qui permet des mesures de vide très précises.

Processus et technique de la lyophilisation

Nous allons reprendre point par point, dans ce chapitre, les différentes phases de la lyophilisation décrites plus haut, et en étudier tant soit peu leur mécanisme intime, ce qui permettra de mieux comprendre les exigences techniques.

Les greffes dure-mériennes une fois stérilisées, lavées et égouttées, seront suspendues dans les tubes à lyophiliser ; à l'intérieur du tube formé par la greffe on disposera, vers son milieu, une petite croix de verre aux pointes effilées, ou tout autre objet permettant de tenir écartées les parois du tube qui, mouillées, ont tendance à s'accoler (ce qui gênerait une bonne dessiccation) ; on évitera pour la même raison que la greffe reste collée aux parois du tube de verre. Les deux parties du tube sont ensuite hermétiquement emboîtées, après avoir appliqué de la graisse à vide stérile * sur le joint rodé. Cette opération devra se faire avec un maximum d'asepsie, dans une salle d'opération, sur une table couverte de champs stériles, l'opérateur s'étant lavé et habillé comme pour une intervention chirurgicale. On n'oubliera pas de flamber le bord du flacon duquel on retirera la dure-mère. Les instruments nécessaires sont une longue pince porte-tampon pour prendre la greffe et une pincette anatomique pour la suspendre. L'extrémité du tube, ouvert, sera protégé par une compresse stérile maintenue par un élastique jusqu'au moment de la dessiccation.

1. *Congélation*

La première phase de la lyophilisation est celle de la congélation, qui doit être faite rapidement et à basse température. Les protéines dispersées dans le solvant aqueux sont, de cette manière, figées sur place, et ne risquent par conséquent pas de se coaguler.

Dès que le produit est congelé, il est stabilisé ; il ne se fait plus aucune croissance bactériologique ni aucun processus enzymatique, ni au cours de la dessiccation, ni pendant la conservation, pour autant que le produit ne se réhydrate pas.

Une autre raison pour laquelle la congélation doit être rapide, est le but qu'on se propose d'obtenir des cristaux aussi petits que possible ; la texture fine de la

* Apiezone Grease.

glace ainsi obtenue augmente le nombre des alvéoles que laissent les cristaux après évaporation ; de ce fait la porosité du produit sera plus grande, permettant une meilleure sublimation des cristaux plus profonds et, plus tard, une vitesse de dissolution plus grande de la greffe lyophilisée.

Si la congélation est lente, les cristaux formés sont de plus grande taille, déchirent les membranes cellulaires et provoquent d'importants dégâts. D'ailleurs, dans la mesure où les résultats des examens histologiques permettent de juger de l'état d'un tissu, on peut dire que l'image histologique des tissus congelés est influencée par la vitesse de refroidissement. L'image histologique d'un tissu convenablement congelé est pratiquement normale ; tout au plus décèle-t-on dans quelques échantillons quelques altérations nucléaires (11).

De par sa forme même, une dure-mère enroulée telle que nous la préparons (voir chap. II) se prête bien à la congélation ; les parois, minces, permettent un refroidissement très rapide, ce qui est plus difficile à obtenir avec un parenchyme plein.

Technique. — Les tubes contenant les greffes seront plongés dans un vase de Dewar ou une cuve contenant un mélange de neige carbonique et d'alcool éthylique (technique) à 90 ou 95°, mélange qui se maintient facilement aux environs de —70° à —80° C. Dans l'appareil que nous employons à Lausanne, le vase contenant ce mélange réfrigérant est monté sur l'appareil lui-même et sert en même temps de condenseur.

Pour produire le froid il faudra remplir la cuve aux deux tiers d'alcool éthylique, puis n'y ajouter tout d'abord que de petits morceaux de glace carbonique ; l'alcool, en effet, est à la température ambiante (22° environ), et l'addition de la glace provoque un bouillonnement intense. Pour éviter un débordement, il faut attendre que le bouillonnement se calme puis, petit à petit, on pourra immerger des morceaux plus volumineux. Il faut environ une demi-heure pour que la température de l'alcool descende à —80°. Les morceaux de glace seront cassés au burin et au marteau, et on prendra la précaution de mettre une paire de vieux gants de cuir pour éviter de se geler les mains.

Les tubes immergés dans ce mélange atteindront en deux à trois minutes la température de —70° C. Il est donc inutile de laisser les tubes plus de cinq minutes dans la cuve. On se rendra compte que les tubes ont atteint la température du mélange par le fait de la cessation des bulles.

2. *Dessiccation*

La seconde phase de la lyophilisation est celle de la dessiccation ; cette opération laisse progressivement libres les espaces entre les molécules protéiques ; d'innombrables canaux sont ainsi formés, par lesquels la vapeur d'eau continue à s'échapper. Greaves écrit que « le succès de la lyophilisation est dû surtout au fait que la dessiccation a lieu à partir de l'état solide, si bien que l'agrégation des molécules et la concentration des sels ne peut se produire ». Le résidu sec, poreux, conserve à peu près le même volume que celui du produit initial ; ce résidu est comparable à une éponge, qui représente le squelette moléculaire du produit de départ ; c'est d'ailleurs grâce à cette structure spongieuse que la redissolution ou le gonflement des substances lyophilisées se fait si rapidement.

Nous avons déjà dit que, pour sublimer 1 gr. de glace il fallait 670 calories. Il y a donc une grande absorption de calories, et la température des greffons baisserait de plus en plus si on ne leur fournissait des calories ; cet abaissement de la température des greffons aurait comme inconvénient que l'opération serait très lente, puisque la tension de vapeur est proportionnelle à la température de la glace. L'apport de calories extérieures augmente donc la quantité de glace sublimée ; mais il faut veiller à ce que cet apport ne soit pas trop grand, sinon la température de la greffe s'élèverait et on courrait le risque d'une décongélation lente, qui amènerait les mêmes conséquences qu'une congélation lente, et serait donc susceptible de causer de graves lésions cellulaires. Il y aurait ébullition de la partie liquéfiée, puisque nous travaillons sous vide.

L'expérience nous a montré qu'il est inutile d'installer une source de chaleur, et que la chaleur ambiante du laboratoire est suffisante pour fournir les calories nécessaires.

On ne sait exactement à quelle température au-dessous de 0° C il est désirable de maintenir une greffe congelée pendant la dessiccation ; les études faites à ce sujet par les auteurs américains (2, 9) montrent que les greffes humaines peuvent probablement être desséchées sans danger jusqu'à une température supérieure de —30° C. La chaleur perdue par la sublimation et le relativement faible apport de calories extérieures font qu'en pratique on ne court aucun risque de décongélation.

Il y a cependant un temps mort, au cours de l'opération, durant lequel les dures-mères subissent un risque de décongélation lente : c'est celui qui se situe entre le moment où l'on sort le flacon contenant la dure-mère du milieu réfrigérant et celui où le vide est fait dans ce flacon. Il faudra donc agir aussi rapidement que possible.

Un autre facteur influençant la vitesse de sublimation à côté de l'apport des calories extérieures, est la surface d'évaporation. Plus grande sera cette surface, pour un volume donné de produit, autrement dit plus mince sera la couche du produit, plus la dessiccation se fera rapidement. Nos dures-mères, minces, et enroulées de façon à ce qu'il n'y ait pas d'accolement (voir plus haut), sont donc, de ce côté-là, un produit répondant bien aux exigences d'une bonne dessiccation.

La vapeur d'eau produite, nous l'avons déjà dit, doit être éliminée du circuit de lyophilisation, afin de ne pas atteindre l'huile de la pompe à vide, ce qui aurait pour effet de diminuer l'efficience mécanique de cette dernière.

Pour ce faire on interpose entre les tubes à lyophiliser et la pompe une paroi froide, réalisée par le moyen d'un condenseur. Le condenseur est représenté, dans l'appareil que nous employons, par un vase de Dewar métallique (le même qui sert à la congélation des greffes) qu'on remplit d'un mélange réfrigérant. La vapeur d'eau sublimée ira se fixer (désublimation) sur les parois du condenseur sous forme d'une fine couche de givre. Il faudra veiller à ce que la température du condenseur soit maintenue en dessous d'une certaine valeur, qui dépend du degré de vide dans l'enceinte de sublimation. Le diagramme des phases pour l'eau (Courbes de Regnault) nous montre qu'à la pression de 0,1 mm. de Hg par exemple, la glace se sublime à la température de —40° C. Si, pour cette pression, la température du condenseur n'atteint pas —40° C, la glace déposée sur ce dernier se sublime à son tour, et le condenseur est inefficace.

A quel moment pourra-t-on arrêter la dessiccation ?

Il faudra tout d'abord atteindre le vide maximum atteignable par l'appareil utilisé ; ce vide est facile à connaître ; il suffira pour cela de faire marcher l'appareil sans substances à lyophiliser ; au bout d'un certain temps, la jauge indiquera une pression qui, lorsqu'elle deviendra invariable, peut être considérée comme le vide maximum atteignable. Ce vide devra être au minimum de 10^{-2} mm. Hg. Lorsque le vide maximum sera obtenu, il faudra continuer à dessécher encore pendant plusieurs heures. Lorsque toute l'eau libre des dures-mères est évaporée, il faudra encore extraire l'eau combinée, ce qui est difficile. La durée de dessiccation totale dépend des qualités de l'appareil employé, du nombre de tubes qu'on lyophilise en même temps et du volume des échantillons à dessécher. Pour notre appareil il faut, pour lyophiliser à la fois six tubes contenant chacun une demi-dure-mère, en moyenne vingt-quatre heures.

Au bout de vingt-quatre heures d'exposition au vide, les dures-mères ont perdu la plus grande partie de leur humidité. L'opération pourra se terminer par le scellage sur place des tubes au chalumeau. Les greffons ainsi obtenus ne sont pas absolument secs ; ils contiennent encore environ 1 % d'eau, mais ceci est parfaitement compatible avec une bonne conservation. (L'Institut national de la Santé des Etats-Unis exige que les produits biologiques lyophilisés n'aient pas plus de 1 % d'humidité finale.)

Technique. — En pratique, l'opération de dessiccation se déroule de la façon suivante : tout d'abord, il faut mettre en marche la pompe à vide quelques heures avant le début de la dessiccation, pour qu'elle puisse s'échauffer suffisamment pour atteindre un bon rendement. Les prises de vide seront obturées par des bouchons, pour que le vide puisse s'installer dans l'enceinte de l'appareil. Les flacons seront ensuite retirés du milieu réfrigérant et aussitôt raccordés aux « tétines » en caoutchouc constituant les prises de vide de l'appareil, après avoir écrasé le caoutchouc par une pince, puis enlevé le bouchon ; sitôt que le tube sera adapté, on ôtera la pince ; on verra alors la jauge indiquer une forte augmentation de pression. Nous avons déjà vu plus haut pourquoi cette opération doit se faire le plus rapidement possible.

Il faudra maintenant laisser se dérouler la dessiccation durant vingt-quatre heures. Nous avons vu qu'aucun apport de calories n'est nécessaire. Deux choses devront être surveillées pendant ce temps : le degré du vide, à l'aide de la jauge thermo-électrique, et la température du milieu réfrigérant. Le degré du vide nous renseignera sur l'évolution du processus, nous indiquera s'il y a une fuite quelque part ou si le fonctionnement de la pompe est perturbé par l'arrivée de vapeur d'eau. La jauge nous indiquera également à quel moment le vide maximum est obtenu.

Quant au mélange réfrigérant se trouvant dans le condenseur, et qui est le même ayant servi, auparavant, à congeler les greffes, il faudra veiller à ce qu'il reçoive un apport régulier de glace carbonique ; les morceaux de glace doivent être introduits dans la cuve toutes les six ou huit heures ; s'il n'y a jamais manque de glace dans la cuve, la température se maintiendra très régulièrement aux environs de —80° C.

Un pain de 10 kg. de glace carbonique suffit à la bonne marche de deux dessiccations successives.

Enfin, au bout de vingt-quatre heures, le caoutchouc à vide unissant chaque tube à l'appareil sera écrasé à l'aide d'une pince. Les tubes seront alors scellés au moyen d'un chalumeau spécial à gaz, après préétirage ou non. Si on veut préétirer, il faut tout d'abord remettre l'appareil à la pression atmosphérique par admission d'air à travers un filtre stérile ; puis, une fois les tubes étirés, on refera le vide, ce qui sera obtenu assez rapidement ; le vide maximum obtenu, on finira de souder les tubes.

Cette manœuvre évitera les craquelures pouvant apparaître dans le tube au moment de la soudure, car celui-ci a une paroi assez épaisse, et le verre, ramolli, est aspiré vers l'intérieur. S'il n'y a pas eu de fissure dans le verre, la luminosité au spectroscope sera semblable à celle d'avant la soudure. S'il y a tout de même fissure dans le verre, on la recouvrira de cire.

Nos tubes sont maintenant prêts à être déposés à la banque. Par mesure de sécurité on pourra augmenter l'étanchéité du joint en lui coulant de la paraffine ou en l'enrobant d'une couche de plastique liquide. Le vide sera contrôlé régulièrement à l'aide d'un spectroscope. Si le vide disparaît et qu'on s'en soit rendu compte assez rapidement, on pourra, si on n'est pas fourni en greffes de façon suffisante, relyophiliser la pièce. Si le ravitaillement est suffisant, il vaudra mieux la jeter.

On ne connaît pas la durée de conservation exacte, mais il est probable qu'elle est de plusieurs années.

On voit donc que la lyophilisation des dures-mères est une opération relativement aisée et réalisable dans n'importe quel centre disposant de l'appareillage nécessaire.

La technique de lyophilisation serait sensiblement plus compliquée et plus délicate à réaliser si les greffes avaient été stérilisées par l'oxyde d'éthylène ; c'est une des raisons pour lesquelles nous avons renoncé à employer cet agent de stérilisation. Il faudrait, en effet, employer de l'air liquide pour refroidir le condenseur, et les tubes devraient être plongés dans un bain réfrigérant durant la dessiccation.

Reconstitution des greffes

Il faudra casser le tube après l'avoir soigneusement désinfecté à l'alcool (attendre l'évaporation, pour éviter l'aspiration d'alcool) ; il est nécessaire de protéger l'endroit du tube devant être cassé par une compresse stérile pour éviter l'aspiration de germes pathogènes.

Une dure-mère lyophilisée se présente comme une feuille grisâtre extrêmement légère. Lors de la dessiccation, seule l'eau pure a été soustraite aux greffes ; il serait logique de les réhydrater au moyen d'eau distillée. Il est cependant préférable d'employer du sérum physiologique, pour éviter que, une fois réhydratée, la greffe baigne dans un milieu hypotonique ; en réhydratant dans du sérum physiologique, ce dernier aura évidemment tendance à devenir hypertonique ; pour cette raison il faudra faire de fréquents lavages.

Il est évident que le sérum utilisé doit avoir une température de 37° C. On pourra y ajouter des antibiotiques (1 million d'unités de pénicilline, 1 gr. de streptomycine), pour autant que le receveur n'est pas sensibilisé à ces derniers ; ceux-ci seront aspirés à l'intérieur de la greffe avec la solution.

Après vingt à trente minutes environ, les greffes ont presque complètement retrouvé leurs propriétés physiques de l'état frais ; elles seront un peu plus pâles que des greffes fraîches. Après la reconstitution, la dure-mère sera légèrement succulente, révélant ainsi un certain degré d'œdème interstitiel.

On pourra l'employer aussitôt.

Bactériologie

Nous avons systématiquement fait faire des examens bactériologiques poussés de nos greffes reconstituées. Nous avons eu le plaisir de constater que les nombreuses cultures faites ont toujours été *stériles*.

Rappelons enfin que l'image histologique d'un tissu lyophilisé reconstitué (comme celle, d'ailleurs, d'un tissu conservé dans un milieu nutritif) doit être normale (11).

VI

QUELQUES RÉSULTATS

Nous n'avons commencé à employer des greffes dure-mériennes à Lausanne que depuis quelques mois. Il nous manque donc le recul nécessaire pour juger des résultats éloignés de ces greffes. Toutefois, les premiers résultats de réimplantation de greffons conservés en milieu nutritif ou lyophilisés nous ont donné, cliniquement, toute satisfaction.

Nous allons rapporter ici nos premières expériences en décrivant brièvement les cinq premiers cas greffés.

Cas n° 1. — R. P., 44 ans, est victime d'un grave traumatisme cranio-cérébral ; il y a fracture ouverte, largement exposée, comminutive, de la région pariéto-occipitale gauche. On fait immédiatement une toilette de la plaie et on ferme par suture de la peau ; il y a eu un défect assez important de la dure-mère ; on ne disposait pas encore à ce moment de greffes de dures-mères, et il avait été fait une plastie avec un morceau de périoste prélevé sur le champ opératoire. Complications post-opératoires sous forme de fistule dure-mérienne (formation d'une poche sous-cutanée de liquide céphalo-rachidien, récidivant constamment après ponction) et d'infection méningée récidivante. Trois mois plus tard, on fait une exploration de la région occipitale, et on trouve un large défect dure-mérien. On greffe alors une dure-mère conservée dans le milieu nutritif, par points séparés de nylon. Dans la suite, plus de fistule ni d'infection.

Cas n° 2. — B. L., 55 ans. Craniotomie pariéto-occipitale droite pour extirpation d'un méningiome para-sagittal. On fait une plastie avec une dure-mère conservée dans le milieu nutritif. Suites simples.

Cas nº 3. — P. D., 51 ans. Craniotomie pariétale gauche pour récidive de méningiome de la convexité ; fixation d'une greffe de dure-mère lyophilisée. Suites simples. Quatre mois plus tard, réouverture du volet cutané pour plastie du défaut osseux. On voit bien la greffe de dure-mère, qui est blanche et a l'air de ne pas être vascularisée ; il n'y a pas de fistule, les bords sont étanches.

Cas nº 4. — P. B., 54 ans. Craniotomie frontale droite pour extirpation d'un méningiome de la convexité. Plastie par une dure-mère lyophilisée. Suites simples.

Cas nº 5. — J. R., 66 ans. Traumatisme cranio-cérébral par coup de feu, causant une fracture embarrée comminutive du crâne intéressant notamment la base (lame criblée). Craniotomie bifrontale, désembarrure, toilette de la plaie. Six semaines plus tard une rhinorrhée s'installe. On réintervient et on fait une plastie avec une dure-mère conservée en milieu nutritif recouvrant la base de l'os frontal. Disparition de la rhinorrhée, qui n'a plus récidivé depuis.

Nous pourrions prolonger cette liste, mais nous pensons que ces quelques cas sont suffisants pour démontrer les résultats immédiats très satisfaisants obtenus dans diverses situations. Il n'y a jamais eu d'infection, et il ne s'est jamais formé de fistule de liquide céphalo-rachidien. Les greffes ont toujours été bien supportées, n'ont entraîné aucune réaction. Nous n'avons pas observé de différence dans les résultats entre les greffes de dures-mères conservées en milieu nutritif et de dures-mères lyophilisées.

Ce qui reste à faire

Nous n'avons fait que jeter les bases d'un travail qui devra être poursuivi ; les résultats originaux obtenus sont pleins de promesses pour l'avenir.

Il est important de savoir quel est l'avenir des greffons réimplantés, de savoir dans quel délai et comment ils vont se vasculariser, de savoir s'ils ne vont pas se calcifier. De nombreuses expériences sont nécessaires, que nous espérons bien réaliser prochainement. Ce n'est qu'après avoir pratiqué de nombreuses greffes et avoir eu l'occasion de les revoir (lors de craniotomies ultérieures ou d'autopsies), d'en avoir étudié l'histologie, qu'on pourra émettre une opinion valable sur ces greffes de dures-mères. Nous nous proposons de faire, à l'avenir, des greffes lors de l'opération de toutes les tumeurs malignes d'un mauvais pronostic que nous aurons à faire, afin de pouvoir étudier, lors de la nécrops, l'évolution de ces greffes.

Les résultats seront communiqués ultérieurement.

RÉSUMÉ

Les situations dans lesquelles il faut combler une solution de continuité de la méninge dure par une greffe sont multiples. Nous avons obtenu d'excellents résultats cliniques immédiats avec des homogreffes dure-mériennes conservées soit en milieu nutritif, soit par lyophilisation. L'auteur rappelle brièvement les principes de la lyophilisation, et décrit la technique suivie pour le prélèvement, la stérilisation, la conservation en milieu nutritif et la lyophilisation des greffes dure-mériennes.

SUMMARY

The situations in which it becomes necessary to reintigrate the continuity of the dural membrane are numerous. We have obtained excellent clinical results with dural homografts which were conserved in nutritive solutions or by lyophilization. The author recalls briefly the principles of the freeze-drying method and describes the technic followed for the obtention, sterilization, conservation in nutritive solutions, and freeze-drying of the human dura-maters.

ZUSAMMENFASSUNG

Der Neurochirurg wird häufig vor die Situation gestellt einen Defekt der Dura-mater schliessen zu müssen. (Schädelhirnverletzungen, posttraumatische Liquorfisteln, Extirpation von Meningeomen.) Zur Deckung dieser Defekte werden verschiedene Methoden angewandt. Der Autor beschreibt zwei Methoden (Konservierung und Lyophilisation der Dura). Es werden die Technik der Gewinnung, der Konservierung, der Sterilisation und einige Resultate beschrieben. Die bisherigen Erfahrungen mit beiden Methoden sind gut.

Je remplis un très agréable devoir en présentant mes sincères remerciements à M. le Dr Charles Hahn, chef du Laboratoire de chirurgie expérimentale du Service universitaire de chirurgie de Lausanne, pour son aide précieuse et aimable.

Je remercie également le Dr E. Zander, assistant spécial de neurochirurgie, pour sa collaboration.

BIBLIOGRAPHIE

1. Fischer, B., C. Adams, R. Wilde, and E. R. Fischer : *The Sterilization and Storage of Lyophilized Blood Vessels.* Ann. Surg., *143 :* 73, 1956.

2. Flosdorf, E. W. : *Freeze-drying.* Reinhold Publishing Co., New York, 1949.

3. Gresham, T. L., and others : *Beta-Propiolactone.* J. Am. Chem. Soc., *70 :* 998, 1948.

4. Gross, R. E., A. H. Bill Jr, and E. C. Peirce : *Methods for Preservation and Transplantation of Arterial Grafts.* Surg., Gyn. and Obst., *88 :* 689, 1949.

5. Hartmann, F. W., S. L. Piepes, and A. M. Wallbank : *Virucidal and Bactericidal Properties of Beta-Propiolactone.* Fed. Proc., *10 :* 358, 1951.

6. Hyatt, G. W., T. C. Turner, and C. A. L. Bassett : *New methods of preserving skin, bone and blood vessels.* Nav. Med. News Ltr., *78 :* 11, 1951.

7. Mangeot, André : *La lyophilisation.* Conférences de la Société de technique pharmaceutique. N° 8, 1955.

8. Sharkey, P. C. : *Lyophilized human dura mater as a dural substitute.* J. Neurosurg., *2 :* 192, 1958.

9. Sauvage, L. R., S. A. Wesolowski, and R. D. Pinc : *Freeze-dry Process for Arteries.* Surgery, *37 :* 585, 1955.

10. Trafas, P. C., R. E. Carlson, G. A. Lo Grippo, and C. R. Lam : *Chemical Sterilization of Arterial Homografts.* A. M. A. Arch. Surg., *69 :* 415, 1954.

11. Lartigue, Jean-Jacques : *Recherches sur la conservation des segments artériels par les méthodes de congélation et de congélation-dessiccation (lyophilisation).* Thèse. Bordeaux, 1955.

Imprimerie La Concorde, Lausanne